

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3438966 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:
C01B 13/02
A 61 K 33/00
A 01 N 59/00
A 61 L 15/00

②1 Aktenzeichen: P 34 38 966.0
②2 Anmeldetag: 24. 10. 84
④3 Offenlegungstag: 24. 4. 86

Behördenbesitz

⑦1 Anmelder:

Oxo Chemie GmbH, 6900 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:

Eitle, W., Dipl.-Ing.; Hoffmann, K., Dipl.-Ing.
Dr.rer.nat.; Lehn, W., Dipl.-Ing.; Fücksle, K.,
Dipl.-Ing.; Hansen, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Brauns, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Görg, K.,
Dipl.-Ing.; Kohlmann, K., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.; Nette,
A., Rechtsanwalt, 8000 München

⑦2 Erfinder:

Kühne, Friedrich-Wilhelm, Dipl.-Chem. Dr., 6900
Heidelberg, DE

⑤4 Zubereitung zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes und deren Verwendung

Zubereitung zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes, enthaltend stabilisierte Chloritmatrices in Lösung, wobei zusätzlich, in getrennter Aufbewahrung, mindestens eine Fe-Porphyrin-Verbindung vorliegt, wobei stabilisierte Chloritmatrices und die Fe-Porphyrin-Verbindung kurz vor dem Gebrauch vereinigt werden. Diese Zubereitungen können als Arzneimittel für Mensch und Tier oder auch zur Desinfektion und Behandlung pflanzlicher Oberflächen mit Vorteil eingesetzt werden.

DE 3438966 A1

24-10-84

3438966

OXO-CHEMIE GMBH, 6900 Heidelberg

Zubereitung zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes
und deren Verwendung

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Zubereitung zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes, enthaltend Chloritmatrices, in Lösung, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß zusätzlich, in getrennter Aufbewahrung, mindestens eine Fe-Porphyrin-Verbindung vorliegt, wobei Chloritmatrices und
5 die Fe-Porphyrin-Verbindung kurz vor dem Gebrauch vereinigt werden.
2. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch g e -
10 k e n n z e i c h n e t , daß die Eisen-Porphyrin-Verbindung eine Häm-Protein-Verbindung darstellt.
3. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch g e -
15 k e n n z e i c h n e t , daß das Fe-Porphyrin proteinfrei ist.
4. Zubereitung nach Anspruch 3, dadurch g e -
k e n n z e i c h n e t , daß gegebenenfalls synthetisch modifiziertes Häm vorliegt.

5. Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Eisen-Porphyrin-Verbindung in etwa äquimolarer Menge zu in stabilisierter Chloritmatrix gebundenem O₂ vorliegt.
6. Verwendung der Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 als Arzneimittel für Mensch und Tier.
7. Verwendung der Zubereitung zum Zweck gemäß Anspruch 6, wobei die Eisen-Porphyrin-Verbindung als Imprägnierung bzw. Bestandteil einer Kompresse, Binde oder eines Pflasters oder als Beaufschlagung eines Katheters oder einer Drainage vorliegt.
8. Verwendung der Zubereitung nach Anspruch 1 bis 5 als bakterizides Mittel, insbesondere zur Wundbehandlung oder Oberflächensterilisation.
9. Verwendung der Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 zur Desinfektion pflanzlicher Oberflächen.

OXO-CHEMIE GMBH, 6900 Heidelberg

Zubereitung zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes
und deren Verwendung

Zubereitungen zur Freisetzung aktivierten Sauerstoffes auf unterschiedlicher Grundlage sind bereits bekannt. In jüngerer Zeit wurden auch Zubereitungen beschrieben, die stabilisierte Chloritmatrices in Lösung enthalten, wobei aus dieser Lösung aktivierter Sauerstoff freigesetzt werden kann.

Die allgemeine Formel dieser stabilisierten Chloritmatrix kann wie folgt beschrieben werden:

10 $\text{ClO}_2^- \cdot n \cdot \text{O}_2$, wobei n die Werte von 0,01 bis 0,25 annehmen kann. Als Beispiel werden Zubereitungen, die Tetrachlordecaoxid (TCDO) enthalten, hier genannt, sie werden zur Deckung des biochemischen Sauerstoffbedarfes und insbesondere zur bakteriziden Wundreinigung

15 angeboten (Oxoferin^R der Anmelderin). Der neuartige Sauerstoffkomplex diffundiert bei lokaler bzw. topischer Verabreichung in das Gewebe ein, wo er durch Biokatalysatoren zu physiologisch unbedenklichen Metaboliten Sauerstoff und Chlorid abgebaut wird. Dabei

20 ist es günstig, daß aktivierter Sauerstoff entsteht.

Die Anwendung von TCDO ist unter anderem in der deutschen Patentanmeldung P 32 13 389.8 (Dr. Friedrich-Wilhelm Kühne) beschrieben, worauf Bezug genommen wird.

5 Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Einsatz solcher stabilisierter Chloritmatrices im Hinblick auf Dosierung, Wirkungseintritt und Steuerung der Abgabe von aktiviertem Sauerstoff in kontrollierter Weise noch zu verbessern. In diesem Zusammenhang
10 wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, in denen unter anderem der Einfluß einer Vielzahl von Verbindungen und anderer Reaktionsparameter auf Lösungen, die stabilisierte Chloritmatrices enthalten, geprüft wurde.

15

Es wurde nun in überraschender Weise gefunden, daß Zubereitungen, die stabilisierte Chloritmatrices in Lösung enthalten, sich hinsichtlich ihrer Abgabe an aktiviertem Sauerstoff in gezielter Weise dadurch
20 steuern lassen, daß sie mit mindestens einer Eisen-Porphyrin-Verbindung in Verbindung gebracht werden, wobei stabilisierte Chloritmatrices und die Eisen-Porphyrin-Verbindung voneinander bis kurz vor dem Gebrauch getrennt aufbewahrt werden. Eine Zusammenführung der Eisen-Porphyrin-Verbindung mit der stabilisierten Chloritmatrices enthaltenden Lösung erfolgt
25 dementsprechend kurz vor dem Gebrauch.

Als Eisen-Porphyrin-Verbindungen können Häm-Protein-
30 Verbindungen zum Einsatz gelangen. Hierunter können Hämoglobin, Peroxidase und Myoglobin oder ein Gemisch hiervon genannt werden. Nach einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die

Eisen-Porphyrin-Verbindung frei von einem Protein-
 anteil zugefügt, da der Proteinanteil die Freisetzung
 des aktivierten Sauerstoffes beeinflusst. Daher ist
 eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung auf Zu-
 5 bereitungen, die Häm enthalten, gerichtet, wobei das
 Häm gegebenenfalls auch synthetisch durch Einbringung
 verschiedenartiger Substituenten in die β, β' -Stellun-
 gen der Pyrrolkerne in üblicher Weise modifiziert sein
 kann.

10

Die Eisen-Porphyrin-Verbindung wird mit Vorteil in
 äquimolarer Menge zu dem in stabilisierten Chlorit-
 matrices gebundenen O_2 eingesetzt; je nach Anwen-
 dungszweck können aber auch geringere Mengen der
 15 Eisen-Porphyrin-Verbindung Einsatz finden.

Die erfindungsgemäße Kombination aus stabilisierte
 Chloritmatrices, insbesondere TCDO, mit Eisen-Por-
 phyrin-Verbindung hat eine bevorzugte Verwendung als
 20 Arzneimittel für Mensch und Tier. Dabei steht die An-
 wendung auf Oberflächen, d.h. topisch, im Vordergrund.
 Hierbei kann es insbesondere um die Desinfektion bzw.
 Heilung schlecht verheilender Wunden etc. gehen. Im
 Rahmen der Erfindung ist es aber auch möglich, Kombi-
 25 nationen aus den vorstehend genannten Eisen-Porphy-
 rin-Verbindungen mit stabilisierten Chloritmatrices,
 insbesondere TCDO, in flüssigen Verabreichungen zusam-
 menzustellen, die unmittelbar nach der Zusammenbrin-
 gung der Komponenten oder zumindest gezielt entspre-
 30 chend dem Zerfallsprofil unter Freisetzung von akti-
 viertem Sauerstoff zur intravenösen Verabreichung vor-
 gesehen sind. Nach einer anderen Ausführungsform der

- Erfindung können auch andere Verabreichungsformen in Betracht kommen, da ein über die Art der Eisen-Porphyrin-Verbindung und deren Menge erreichter gesteuerter zeitlicher Abbau der stabilisierten Chloritmatrices, insbesondere von TCDO, unter Freisetzung einer dosierten Menge aktivierten Sauerstoffes erzielbar ist. Dies wird aus den nachfolgenden Versuchsbeispielen noch deutlicher.
- 10 Soweit der Einsatz der erfindungsgemäßen Zubereitung zur Wundbehandlung bzw. zur Desinfektion bakteriell infizierter Oberflächen infrage kommt, ist es im Rahmen der Erfindung besonders bevorzugt, die Eisen-Porphyrin-Verbindung als Imprägnierung bzw. Bestandteil
- 15 einer Kompresse, Binde oder eines Pflasters vorzusehen. Es kann dann die stabilisierte Chloritmatrices enthaltende Lösung direkt auf die Wunde aufgegeben werden, die dann mittels der Eisen-Porphyrin-haltigen Kompresse, Binde oder des Pflasters abgedeckt wird. In
- 20 Berührung mit einer derart imprägnierten bzw. Eisen-Porphyrin-haltigen Abdeckung läßt sich z.B. aus TCDO der aktivierte Sauerstoff noch gezielter freisetzen. In analoger Weise kann aber auch eine Beaufschlagung auf Katheder oder von Drainagen zu diesem Zweck erfolgen.
- 25

Die erfindungsgemäße Zubereitung ist nicht nur als Arzneimittel sondern auch zu anderen Anwendungszwecken vorgesehen. Hierbei steht insbesondere die Desinfektion und Konservierung pflanzlicher Oberflächen im Vordergrund, wie z.B. von Lebendpflanzen, aber auch von Saatgut etc.. Zu diesem Zweck kann eine Aufbringung auf die Pflanzen oder Pflanzenteile (häufig den

30

- Blattbereich) bzw. das Saatgut auf verschiedenartige Weise, vorzugsweise aber durch Aufsprühen von Lösungen bzw. Dispersionen erfolgen. Hierdurch wird u.a. die strukturelle Resistenz und vor allem Frostbeständigkeit von vielen Kulturpflanzen verbessert. Beispiels-
haft können genannt werden: Tomate, Kartoffel, Tabak, Hopfen, Bohnen, etc., aber auch Bäume, wie Fichte, Tanne, Laubbäume, wie Buche, Eiche, etc..
- 10 Die Effektivität der Beifügung verschiedenartiger Eisen-Porphyrin-Systeme zu stabilisierten Chloritmatrices, insbesondere TCDO-Lösung, wird nachstehend in den Beispielen weiter erläutert. In diesen ist die Zersetzung von Indikatorverbindungen beschrieben, die
15 auf aktivierten Sauerstoff ansprechen. Als solche Aktivatorverbindungen wurden 1'-Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC) bzw. S'-Methyl-alpha-ketobutyrsäure (KMB) unter anderem herangezogen.
- 20 In der nachstehenden Tabelle 1 ist die Oxidation von S'-Methyl-alpha-ketobutyrsäure (KMB) durch TCDO beschrieben, dem zusätzlich Peroxidase (POD) zugesetzt wurde. Es wurden jeweils 2 ml Reaktionsvolumen mit 0,1 M Phosphatpuffer zur Einstellung eines pH-Wertes von
25 7,8 herangezogen. Es wurden 5 mM KMB zugesetzt, wobei sich bei einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 22 °C die nachstehenden Zersetzungsraten, ausgedrückt in Ethylen, ergaben. In der Tabelle bedeutet OF eine handelsübliche TCDO-Lösung, die unter dem Namen Oxoferin®
30 (Hersteller OXO Chemie, abgekürzt OF) vertrieben wird.

Tabelle 1

	Zufügung	pmol Ethylen/45 Min.
5	KMB	0
	KMB + OF (10 ul)	0
	KMB + POD (10 U)	0
	KMB + OF + POD	3700
	KMB + OF + POD + 100 U Katalase	
10	(oder SOD)	3640 (3800)

Aus der Tabelle ergibt sich in überraschender Weise, daß KMB durch TCDO allein im beobachteten Zeitraum
 15 nicht angegriffen wurde, während ein rascher Zerfall bei Zufügung von Peroxidase (POD) beobachtet werden kann.

In der nachstehenden Tabelle 2 wurden 2 ml Reaktions-
 20 volumen mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,8); 1 umol l-Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC) sowie 10 umol OF einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 22 °C unterworfen. Dabei ergaben sich die folgenden Ergebnisse
 25 bei Zufügung unterschiedlicher, Eisen-Porphyrin-haltiger Systeme.

Tabelle 2

	<u>Zufügung</u>	<u>pmol Ethylen/45 Min.</u>
5	ACC + OF	20
	ACC + OF + POD (10 U)	1668
	ACC OF + Katalase (100 U)	16
	ACC + OF + Hämoglobin ($10^{-5}M$)	1525
	ACC + OF + Cytochrom c ($10^{-5}M$)	336
10	ACC + OF + Fe^{2+} ($10^{-5}M$)	24
	ACC + OF + Fe^{3+} ($10^{-5}M$)	22

- Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, daß unter anderem die Zufügung von Peroxidase und Hämoglobin zu einem raschen Angriff auf ACC über die Freisetzung aktivierten Sauerstoffes führt. Überraschenderweise wird dies durch TCDO allein (symbolisiert durch OF) bzw. in Gegenwart von Eisen-Salz nicht erreicht.
- 20 Die verschiedenen Eisen-Porphyrin-Verbindungen haben einen eigenen Einfluß auf den Zerfall des TCDO-Systems. So wurde unter hier nicht im Detail erläuterten Versuchsbedingungen bei Zufügung von Peroxidase eine Aktivitäts-Halbwertzeit von etwa 30 bis 40 Minuten beobachtet, während die Zufügung von Eisen-II-Plus-Hämoglobin ein Aktivitätsmaximum nach etwa 30 minütiger Präinkubation ergab. Hiernach begann eine Inaktivierungsphase, die etwa 1 1/2 Stunden andauerte.